Bull. Soc. Path. Ex., **83**, 1990, 320-329

PARASITOLOGIE

ÉVOLUTION DE LA CHIMIOSENSIBILITÉ DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* A LA CHLOROQUINE ET A LA MÉFLOQUINE AU BÉNIN ENTRE 1980 ET 1989

Par J.-P. CHIPPAUX (1), A. MASSOUGBODJI (2), M. AKOGBETO (3), R. JOSSE (4), T. ZOHOUN (5) & B.-C. SADELER (6) (7)

RÉSUMÉ

La résistance de Plasmodium falciparum *à la chloroquine est signalée en 1986 chez des touristes revenant du Bénin. La surveillance de ce phénomène a été organisée dans le temps et l'espace avec des moyens rudimentaires, mais qui ont permis de montrer son importance et ses limites.*

D'emblée de niveau élevé dans la région de Cotonou, la résistance à la chloroquine a concerné jusqu'à 50 % des souches étudiées. Toutefois, depuis 1986, la résistance semble stationnaire et aurait même tendance à régresser. En région rurale, la résistance à la chloroquine reste faible, sinon marginale. Les auteurs constatent que la dynamique de la chloroquinorésistance au Bénin ne peut s'expliquer par la seule pression médicamenteuse. Ils émettent l'hypothèse qu'une sélection des souches pourrait être faite par certains vecteurs.

Quant à la résistance à la méfloquine, elle est pratiquement inexistante à Cotonou, mais se rencontre avec une fréquence plus élevée en zone rurale (Province du Zou).

Mots-clés : CHLOROQUINE, MÉFLOQUINE, PALUDISME, *Plasmodium falciparum,* RÉSISTANCE, BÉNIN.

SUMMARY

Development of resistance of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and mefloquine in Benin during heighties.

Resistance of P. falciparum *to chloroquine has been notified in 1986 in non-immune visitors. Authors organized surveys of* in vivo *and* in vitro *tests to follow evolution of the phenomena.*

(1) Médecin entomologiste ORSTOM, Centre OCCGE de Cotonou. Adresse actuelle : Centre Pasteur du Cameroun, BP 1274, Yaoundé, République du Cameroun.

(2) Médecin, Professeur-assistant de Parasitologie, Faculté des sciences de la santé, BP 188, Cotonou, République du Bénin.

(3) Entomologiste médical, Directeur du Centre OCCGE de Cotonou, BP 06-2604, Cotonou, République du Bénin.

(4) Médecin, Coopération française, Épidémiologiste au Ministère de la Santé publique de la République du Bénin.

(5) Professeur de Santé publique, Directeur de la Protection sanitaire nationale, Ministère de la Santé publique de la République du Bénin.

(6) Professeur de Parasitologie à la Faculté des sciences de la santé, Cotonou, République du Bénin.

(7) Manuscrit n° 972. Séance du 9 mai 1990.

The increase in number of P. falciparum *strains resistant to chloroquine was sudden in 1986 but stopped to rise from this date, and even seemed to decrease gently. The geographical distribution of the resistance, restricted to the region of Cotonou, could be explained by illegimate chloroquine distribution. But authors propose further investigations on relations between chloroquine resistant strains and the 3 anophelian species involved in malaria transmission in Benin.*

Resistance to mefloquine is rare in Cotonou region, but higher in rural zone.

Key-words: CHLOROQUINE, MALARIA, MEFLOQUINE, *Plasmodium falciparum,* RESISTANCE, BENIN.

INTRODUCTION

L'Afrique de l'Ouest a semblé longtemps épargnée par le phénomène de chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine. Diverses enquêtes menées dans plusieurs pays au cours de la première moitié de cette décennie n'ont pas permis la mise en évidence de souches résistantes aux amino-4-quinoléines, en dehors de quelques cas exceptionnels (4-11).

Au Bénin, deux études faites par KINIFFO en 1982 (13) et par ADÉCHOKAN en 1984 (1) avaient confirmé l'absence de souches résistantes à la chloroquine. Les premiers cas de résistance sont apparus brutalement chez des sujets revenant du Bénin, hospitalisés en France pour des accès palustres graves ne cédant pas au traitement spécifique bien conduit (14-17). Depuis, le Ministère de la santé publique béninois s'efforce d'instaurer un réseau de surveillance avec l'aide de l'OCCGE et du laboratoire de parasitologie de la Faculté des sciences de la santé.

Une première évaluation de la sensibilité *in vivo* a été faite à Cotonou en janvier 1987 (15). 34 % des souches présentaient une résistance de type R I ou R II après administration de 25 mg.kg^{-1} de chloroquine. Une enquête effectuée au Bénin par l'équipe OCCGE du centre Muraz à la même époque, mais dans d'autres quartiers de Cotonou, a confirmé ces résultats (12). Un taux très élevé de chloroquinorésistance était mis en évidence tant *in vivo* que *in vitro,* respectivement 52 % et 58 % des souches testées. En juillet et août 1987, une enquête dans le Zou, à 200 km au nord de Cotonou, permettait d'établir un taux de résistance *in vivo* voisin de 5 % (10). En octobre et novembre de la même année, une vaste enquête *in vitro* menée à Cotonou et dans le Zou (fig. 1) a montré que la fréquence de souches résistantes étaient respectivement de 46 % et 17 % pour la chloroquine. La résistance à la méfloquine atteignait 3 % et 11 % des souches testées (9). En 1988 et 1989, lors de plusieurs enquêtes, nous avons testé *in vivo* et *in vitro* la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine ou à la méfloquine dans la région de Cotonou et de Porto-Novo.

Cet article a pour objectif de faire la synthèse des résultats obtenus et de montrer la tendance générale des variations observées dans la chimiosensibilité des souches de *P. falciparum* à la chloroquine et à la méfloquine dans le sud du Bénin.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1) *Choix des sujets.* — Nous avons mené ces études chez des élèves de 6 à 12 ans, en bonne santé apparente, recrutés dans une quinzaine d'écoles de base

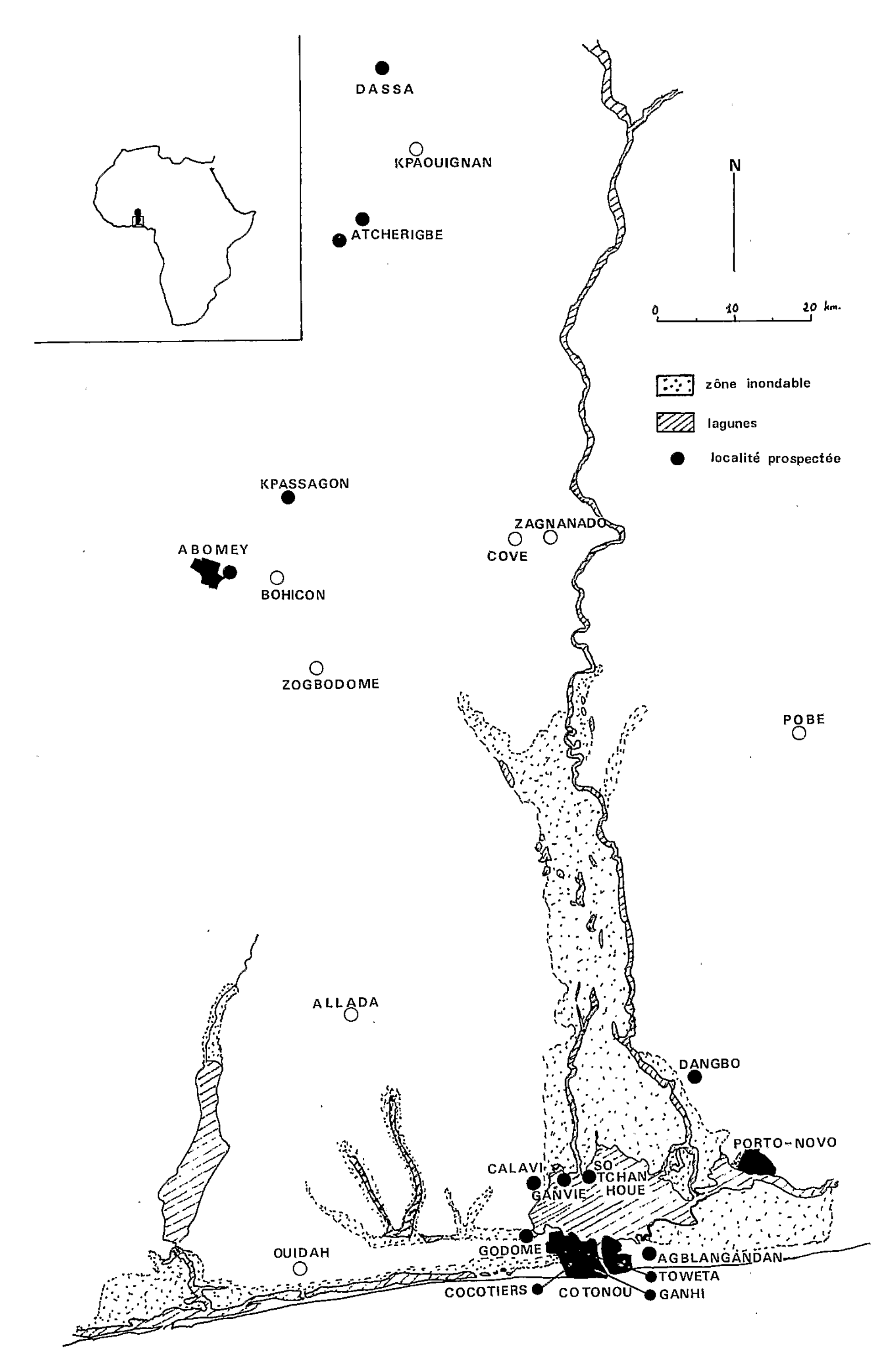


Fig. 1. — Situation géographique des localités où se sont déroulés les tests de chimiosensibilité. La région de Cotonou comprend la zone lagunaire et le Zou s'étend au nord d'Abomey.

dispersées dans la région de Cotonou et selon un axe sud-nord reliant la côte au centre du pays. Les enfants de cet âge, en zone de paludisme holoendémique, présentent souvent une parasitémie élevée en raison de leur état de prémunition instable. Le choix des écoles a été dicté par le double critère d'une distribution géographique aussi large que possible et d'un effectif suffisant pour être représentatif d'une situation et d'un moment donnés. Dans chaque école prospectée, tous les élèves présents le jour de l'enquête ont participé à l'étude.

2) *Prélèvements.* — Ils sont effectués, le matin, à la pulpe du doigt à l'aide d'un vaccinostyle stérile. Le frottis est lu immédiatement sur le terrain. La lecture de 30 champs de frottis permet de dépister une densité parasitaire supérieure ou égale à 500 globules rouges parasités/mm^3. En début d'après-midi, les enfants qui présentent une charge supérieure à 500 parasites/mm^3 sont convoqués pour le test de sensibilité proprement dit. Un interrogatoire, parfois associé à un test urinaire (3), permet d'écarter les sujets ayant récemment pris un antimalarique. Les enfants ayant un test urinaire positif, ou ayant reçu un antimalarique depuis moins de quinze jours sont exclus de l'étude.

3) *Tests* in vivo. — Les enfants définitivement retenus pour l'enquête sont de nouveau prélevés pour contrôle de la parasitémie. Une dose de 10 $mg.kg^{-1}$ de chloroquine leur est administrée le jour même (J_0), puis le lendemain. Une dose de 5 $mg.kg^{-2}$ est donnée le troisième jour. La prise de chloroquine est effectuée en présence du médecin. Les sujets chez qui surviennent des vomissements au cours des cinq premiers jours de l'enquête sont exclus de l'étude. Dans la plupart des protocoles, le contrôle de la parasitémie a été effectuée à J_1, J_2, J_4, J_5, J_7 ou J_8. Dans quelques cas, le contrôle a été effectué à J_4, J_5 et J_7 ou J_8. Le seuil de lecture de la parasitémie lors des tests *in vivo* a été systématiquement ramené à 75 globules rouges parasités/mm^3. Ces seuils de parasitémies correspondent approximativement à la lecture de 200 champs de frottis lus à l'immersion avec des oculaires « grands champs » (7). Les enfants positifs le septième jour sont traités avec un autre antimalarique (sulfadoxine-pyriméthamine).

4) *Tests* in vitro. — Les enfants, choisis dans les mêmes conditions que pour les tests *in vivo,* mais dont la densité parasitaire est supérieure ou égale à 3 000 globules rouges parasités/mm^3, font l'objet d'un prélèvement de 100 μl de sang périphérique à l'aide d'un capillaire hépariné et calibré. Le prélèvement est ramené, à température ambiante, au laboratoire où les microplaques de titrage OMS sont ensemencées, puis mises à incuber sous cloche à 37° C durant 24 heures. Les culots de chaque godet sont alors déposés sur une lame. Celle-ci est séchée 24 heures, colorée au Giemsa, puis lue et interprétée selon les directives de l'OMS (16). Pour la chloroquine, nous avons considéré le seuil de résistance à 1,2 pmol/mm^3. Pour la méfloquine, nous avons admis l'existence d'une résistance lorsque l'inhibition de la schizogonie apparaissait pour des concentrations égales ou supérieures à 0,8 pmol/mm^3.

RÉSULTATS

Le dépistage des enfants porteurs d'une parasitémie à *P. falciparum* suffisante pour entrer dans l'étude a été effectué chez 4 154 enfants pour les tests *in vivo*

et chez 3 656 pour les tests *in vitro*. 428 tests *in vivo* ont été effectués et 114 tests *in vitro* ont été menés à bien sur les 140 essayés. Le résultat des différents tests *in vivo* et *in vitro* effectués entre 1982 et 1989 sont donnés dans le tableau I.

Avant 1986, aucun indice ne permet de conclure à l'existence d'une quelconque résistance de *P. falciparum* à la chloroquine. Au plan clinique, nous n'avions jamais constaté d'échec thérapeutique avéré au traitement par les amino-4-quinoléines pas plus chez les sujets prémunis que chez les enfants béninois ou même chez les expatriés.

Dès l'isolement des premières souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine, nous avons renforcé la surveillance *in vivo* et organisé des enquêtes de chimiosensibilité *in vitro*. Au cours de l'année 1987, les divers tests montrent, qu'à Cotonou, la prévalence de la résistance est d'environ 50 %, sauf à Agblangandan,

TABLEAU I

Prévalence de la résistance de P. falciparum *à la chloroquine et à la méfloquine au Bénin.*

Réf.	Date	Localité	nb.	% RI	% RII	% RIII	% *in vitro*
(13)	1982	Cotonou	64*	0	0	0	-
(1)	1984	Cotonou	51*	0	0	0	-
(14)	1986	Bénin	apparition de la résistance				
(15)	jan. 87	Cotonou	42	24	10	0	-
(12)	fev. 87	Cotonou	65*	45	8	0	-
"	idem "	Cotonou	36 C	-	-	-	58
"	idem "	Cotonou	33 M	-	-	-	3
(10)	jul. 87	Zou	72	3	1	0	-
(9)	oct. 87	Cotonou	41 C	-	-	-	46
"	idem "	Cotonou	50 M	-	-	-	3
"	idem "	Zou	18 C	-	-	-	18
"	idem "	Zou	18 M	-	-	-	11
NP	jun. 88	Cotonou	46*	8	2	0	-
NP	jun. 89	Cotonou	40*	27	0	0	-
NP	jun. 89	Cotonou	19 C	-	-	-	11
NP	jun. 89	Cotonou	13 M	-	-	-	8
NP	nov. 89	Porto-Novo	48*	19	4	2	-

* : pas de recherche de chloroquinémie.
C : micro-tests pour l'évaluation de la réponse à la chloroquine.
M : micro-tests pour l'évaluation de la réponse à la méfloquine.
NP : non publié.

dans la proche banlieue (15), où la fréquence de souche résistante paraît discrètement plus faible (35 %). Dans le Zou, à quelque 150 ou 250 km au nord de Cotonou, la résistance reste peu fréquente. Dès 1988, tant *in vivo* que *in vitro,* la fréquence de souches résistantes paraît diminuer tandis que le niveau de sensibilité se maintient (fig. 2).

La comparaison de la fréquence de résistance et des niveaux de résistance de *P. falciparum* à la chloroquine en fonction des localités et des saisons n'a pu être menée de façon rigoureuse faute de moyens suffisants. La différence entre Cotonou et le Zou est manifeste tant *in vivo* que *in vitro.* A l'intérieur de la zone urbaine de Cotonou, nous n'avons pas décelé de différence notable entre les quartiers, ni même dans les localités autour de Cotonou. Nous n'avons pas observé de variation saisonnière significative de la prévalence de la résistance, mais cela peut être lié au faible nombre de souches testées.

Concernant la sensibilité de *P. falciparum* à la méfloquine, médicament de relais potentiel, elle est nette (fig. 3) et, entre 1986 et 1989, ne semble pas beaucoup évoluer. Dans le Zou, la résistance à la méfloquine a été notée dès 1987, à un faible niveau, quoique plus élevé qu'en région lagunaire, à l'inverse de la chloroquinorésistance.

Nous n'avons pas observé de corrélations entre les résistances à la méfloquine et à la chloroquine. Sur les 86 souches testées simultanément à la chloroquine et à la méfloquine, aucune ne s'est révélée résistante aux deux antimalariques

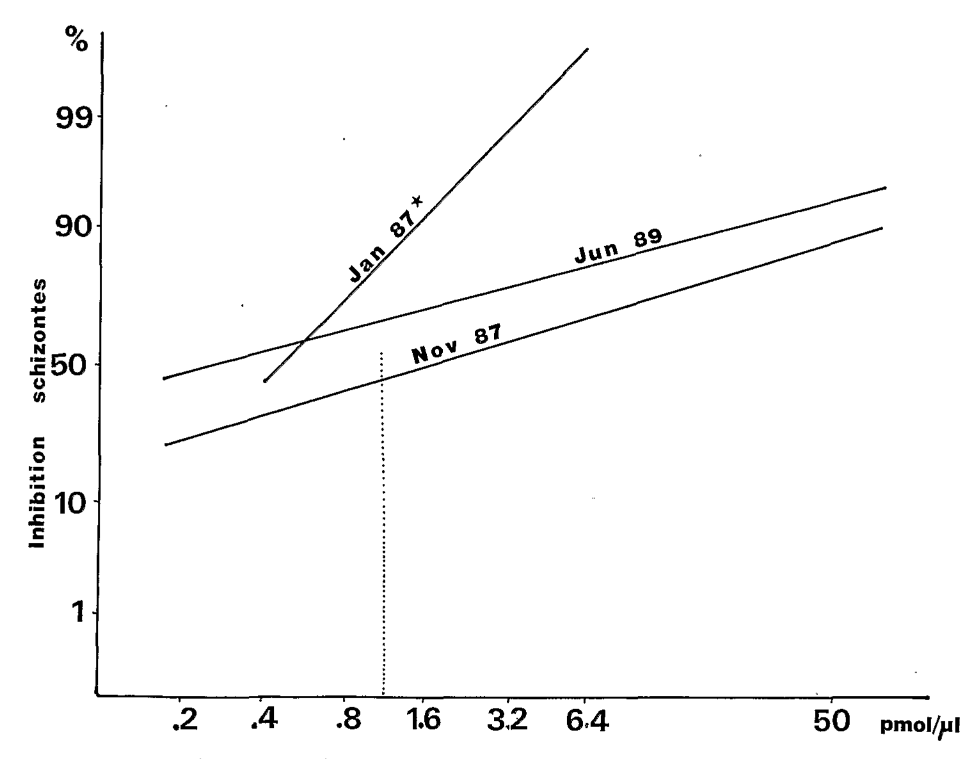


Fig. 2. — Droite log-probit représentative de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à la chloroquine dans la région de Cotonou (Jan. 87 : d'après GUIGUEMDE *et al,* 1987).

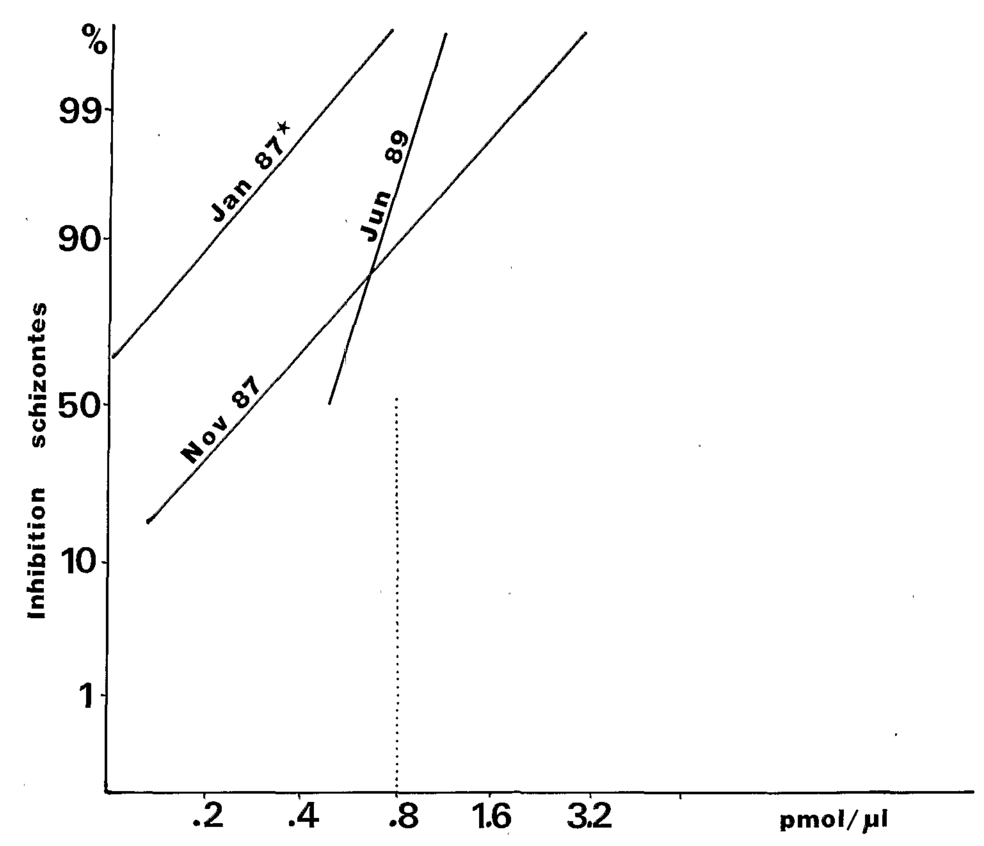


Fig. 3. — Droite log-probit représentative de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à la méfloquine dans la région de Cotonou (Jan. 87 : d'après GUIGUEMDE *et al.*, 1987).

à la fois. Dans cette série, la fréquence de chloroquinorésistance est de 38 % et celle de méfloquinorésistance est de 2 %. La probabilité d'une résistance croisée est de 0,7 %, soit identique au résultat observé.

DISCUSSION

L'apparition de la chloroquinorésistance s'est faite brutalement et à un niveau d'emblée élevé. L'hypothèse d'une chloroquinorésistance ancienne, circulant à Cotonou et révélée fortuitement (12), nous paraît discutable au regard des observations cliniques que nous avons pu faire à Cotonou ces dernières années et des enquêtes *in vivo* menées systématiquement depuis 1982. Toutes ont montré de façon univoque la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine.

La chloroquinorésistance ne semble pas s'être aggravée, comme on aurait pu le craindre. Sa prévalence, loin de s'accroître, s'est maintenue depuis 1986 et même, semble-t-il, a légèrement diminué. Au plan géographique, la résistance ne s'est pas étendue aux régions rurales voisines, pourtant en très étroite connexion avec

Cotonou. Du moins l'extension ne s'est-elle pas faite avec la même brutalité ni la même intensité que l'apparition de la résistance ne s'est produite à Cotonou. L'évolution de l'inhibition de la schizogonie en présence de chloroquine entre novembre 1987 et juin 1989 (fig. 2 et 4) peut s'interpréter comme une bonne stabilité de la chloroquinorésistance. En revanche, la faible prévalence de la méfloquinorésistance ne permet pas d'argumenter sur l'apparente stabilité (fig. 3 et 4) de la résistance. Enfin, il est curieux de constater que la prévalence de la résistance n'est pas augmentée par l'accroissement de la transmission du paludisme entre juin, début de la saison de forte transmission, et novembre, fin de la saison des pluies.

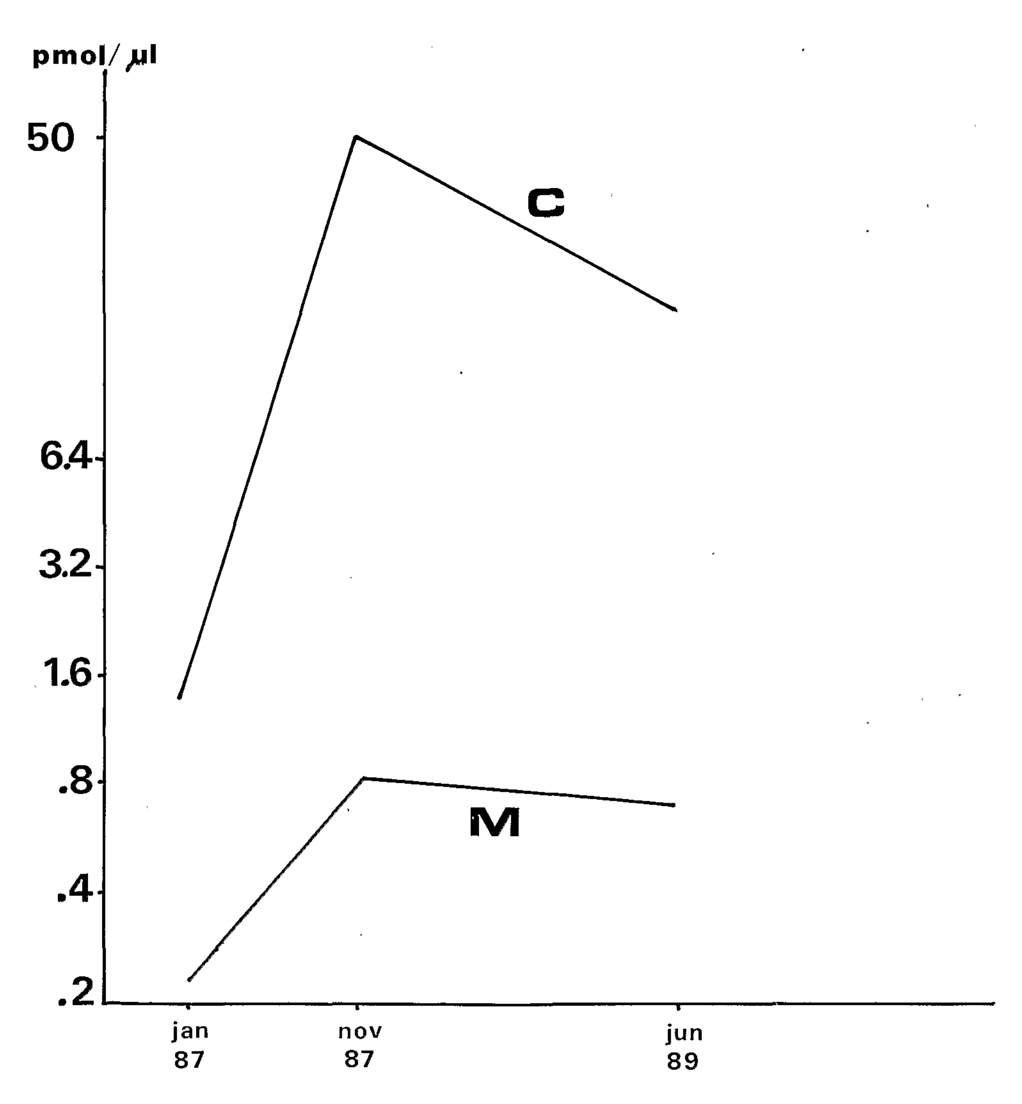


Fig. 4. — Évolution de la concentration d'antimalarique inhibant la schizogonie de 90 % des souches de *P. falciparum* entre janvier 1987 et juin 1989.

Parmi les causes de l'apparition d'une résistance de *P. falciparum* aux antimalariques (5), la pression médicamenteuse passe pour essentielle. Ce fut notamment le cas en Asie du Sud-Est. Pourtant d'autres facteurs doivent être ici incriminés. D'abord la résistance n'est pas apparue ailleurs en Afrique de l'Ouest avec une telle ampleur malgré des conditions similaires d'utilisation de la chloroquine. Ensuite, elle ne s'est pas répandue autour de la région de Cotonou, pas même ne s'est-elle renforcée à l'intérieur de Cotonou, comme elle aurait dû le faire si la pression médicamenteuse était la raison principale de son apparition. Il est à noter que la migration des populations de parasites n'a pas non plus joué de rôle disséminateur.

La cause de cette brutalité de survenue et de l'absence d'extension doit être recherchée, à notre avis, dans des conditions écologiques particulières. D'une part, il est intéressant de constater que l'émergence de la chloroquinorésistance est contemporaine d'une remarquable élévation de tous les indices entomologiques et parasitologiques au cours de la forte saison des pluies 1986 qui suivait une longue période de sécheresse (2-6). En 1987, alors que les indices paludométriques restaient contenus dans des limites nettement inférieures, la confirmation de la chloroquinorésistance a été administrée cliniquement lors d'une épidémie de paludisme limitée à la population expatriée (8). La chloroquinorésistance ne s'est toutefois pas étendue. D'autre part, il convient de noter la particularité de transmission du paludisme dans la région lacustre de Cotonou, où sévit la résistance. En région lagunaire, deux vecteurs sont présents, *An. gambiae* s.s., abondant en saison des pluies et *Anopheles melas,* dont les larves sont haliophiles. Il est probable que cette dernière espèce soit un médiocre vecteur (2), mais elle est dominante dans de nombreuses localités et surtout reste le seul vecteur potentiel pendant la saison sèche. En région rurale, deux vecteurs se partagent l'essentiel de la transmission limitée à la saison des pluies : *An. gambiae* s.s. et *An. funestus.* Ainsi, certains vecteurs favoriseraient la sélection de souches résistantes, dont la diffusion sinon l'amplification seraient assurée par d'autres vecteurs. Cette hypothèse aurait, en outre, le mérite d'expliquer la stabilité saisonnière de la prévalence de la chimiorésistance. Nous pensons pouvoir vérifier le rôle des vecteurs dans l'apparition et le maintien de la résistance en effectuant des tests de sensibilité toute l'année dans des biotopes caractéristiques de chacune des espèces vectrices du paludisme au Bénin.

A l'inverse de la chloroquinorésistance, la résistance à la méfloquine est plus rare et d'un niveau inférieur. Cela n'est d'ailleurs pas en contradiction avec notre hypothèse. Il est remarquable que la résistance à ces deux antimalariques soit indépendante, voire dissociée : à une prévalence plus élevée de chloroquinorésistance en région lagunaire, semble s'opposer une plus forte prévalence de méfloquinorésistance en savane. En outre, la pression médicamenteuse ne peut être invoquée dans ce cas.

Remerciements

Ce travail a bénéficié d'une aide financière spéciale de la Mission française de Coopération et d'Action culturelle de Cotonou. Nous tenons à remercier M. Michel Monfort, Chef de Mission, pour le soutien qu'il nous a accordé.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADECHOKAN (S. V.). — Approches épidémiologiques du paludisme à *Plasmodium falciparum* en milieu urbain. Thèse Doc. Méd., Cotonou, 1985, n° 213, 101 p.
2. AKOGBETO (M.), CHIPPAUX (J.-P.) & COLUZZI (M.). — Le paludisme urbain côtier à Cotonou, République Populaire du Bénin. 1. Étude entomologique. *Épidémiologie Tropicale,* sous presse.
3. BERQVIST (Y.), HED (C.), FUNDING (L.) & SUTHER (A.). — Determination of chloroquine and its metabolite in urine: a field method based on ion-pair extraction. *Bull. WHO,* 1965, **63,** 893-898.
4. BRANDICOURT (O.), DRUILHE (P.), DIOUF (F.), BRASSEUR (P.), TURK (P.) & DANIS (M.). — Decrease sensitivity to chloroquine and quinine of some *Plasmodium falciparum* strains from Senegal in September 1984. *Am. J. trop. Med. Hyg.,* 1986, **35,** 717-721.
5. CHARMOT (G.) & RODHAIN (F.). — La chimiorésistance chez *Plasmodium falciparum.* Analyse des facteurs d'apparition et d'extension. *Méd. Trop.,* 1982, **42,** 417-426.
6. CHIPPAUX (J.-P.) & AKOGBETO (M.). — Le paludisme urbain-lagunaire. Enquête longitudinale à Cotonou. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. méd. Parasitol.,* 1989, **27,** sous presse.
7. CHIPPAUX (J.-P.), AKOGBETO (M.), MASSOUGBODJI (A.) & ADJAGBA (J.). — Mesure de la parasitémie palustre et évaluation du seuil pathogène en région de forte transmission. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. méd. Parasitol.,* 1989, **27,** sous presse.
8. CHIPPAUX (J.-P.), DU SAUSSAY (C.) & AKOGBETO (M.). — Intérêt du dosage des anticorps immunofluorescents dans le diagnostic du paludisme en zone d'endémie. *Méd. Trop.,* 1989, **49,** 409-413.
9. CHIPPAUX (J.-P.), MASSOUGBODJI (A.), GAY (F.), OLLIARO (P.), CALIGARIS (S.) & DANIS (M.). — Sensitivity *in vitro* of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and mefloquine in two regions of Benin. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.,* 1989, **83,** 584-585.
10. DJIVOH (C.), MASSOUGBOGDJI (A.), TURK (P.), FAYOMI (E. B.), GAY (F.) & DANIS (M.). — Faible niveau de chloroquinorésistance de *Plasmodium falciparum* dans la Province du Zou au Bénin. *Bull. Soc. Path. Ex.,* 1988, **81,** 332-337.
11. DRUILHE (P.), BRASSEUR (P.), BRANDICOURT (O.), KOUAMOUO (J.), RICHARD-LENOBLE (O.), DIOUF (F.), GAY (F.), MOYOU (S. R.), DANIS (M.), KOMBILA (M. Y.), DIALLO (P.) & GENTILINI (M.). — *Plasmodium falciparum* drug resistance in West Africa. *Ann. Soc. belge Med. trop.,* 1986, **66,** 297-300.
12. GUIGEMDE (T. R.), OUEDRAOGO (J. B.) & GBARY (A. R.). — Étude de la chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* à Cotonou. Document technique OCCGE, Bobo-Dioulasso, 1987, n° 9.39.87.
13. KINIFFO (F. J.). — Sensibilité de *Plasmodium falciparum* aux amino-4-quinoléines (chloroquine) : tests *in vivo* dans le DUC IV. Thèse Doc. Méd., Cotonou, 1982, n° 24, 90 p.
14. LE BRAS (J.), HATIN (I.), BOURÉE (P.), COCO-CIANCI (O.), GARIN (J.-P.), REY (M.), CHARMOT (G.) & ROUE (R.). — Chloroquine-resistant falciparum malaria in Benin. *Lancet,* 1986, **ii,** 1043-1044.
15. MASSOUGBODJI (A.), CHIPPAUX (J.-P.), AISSI-YEHOUESSI (E.), AKOGBETO (M.) & SADELER (B.-C.). — Étude de la chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine dans la ville de Cotonou. Soc. médicale de Bénin, 18 mars 1987, à paraître dans *Bénin Médical.*
16. OMS. — Mode d'emploi du nécessaire d'épreuve (Microtest) pour l'évaluation de la réponse de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la méfloquine *in vitro.* OMS, Genève, MAP/84.2, 1984.
17. ROSENHEIM (M.), PRAZUCK (T.), BRANDICOURT (O.), DIQUET (B.), DATRY (A.), DANIS (M.) & GENTILINI (M.). — Five cases of chloroquine-resistant malaria in Benin, Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,* 1987, **81,** 498.